

乳酸菌が脂質代謝に与える影響についての 培養腸管細胞 Caco2 を用いた検討

富重慶子・松島照彦

食生活科学科 臨床栄養学研究室

The effect of *Lactobacillus acidophilus* strain L-55 on chylomicron apoB48 synthesis and secretion by cultured intestinal cells.

Keiko TOMISHIGE, Teruhiko MATSUSHIMA

Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University

Postprandial hyperlipidemia has been noted as a risk factor in cardiovascular diseases and cell biological studies targeted on intestinal tract is important for the analysis of the secretion of chylomicron. Meanwhile, preventive potentials for atherosclerosis were reported in many functional foods and food components. In order to elucidate the effect of lactic acid bacteria on chylomicron metabolism, we investigated the secretion of apolipoprotein B48 (apoB48) in cultured intestinal cells. Human intestinal cell line Caco-2 cells were cultured on the pored membrane of double-based dishes and *Lactobacillus acidophilus* strain L-55 was added with lipid micelles to the upper chamber. We established an anti-apoB-48 monoclonal antibody, and apoB-48 secreted into the medium was quantified by ELISA. By the addition of L-55, apoB48 secretion was significantly decreased as compared to the control. There was no difference in the decrease between living cells and the heat-killed cells. However, there was a difference in the amount secreted by the timing of the addition and the number of lactic acid bacterium. An observed reduction in the secretion of apo B48 is considered to indicate a decrease in the chylomicron particle numbers. It was suggested that *Lactobacillus* L-55 may be useful in the control prevention of arteriosclerosis.

Key words : *Lactobacillus acidophilus* Strain L-55 (乳酸菌 L-55 株), chylomicron (カイロミクロン), apoB48 (アポ蛋白 B48), Caco-2 (ヒト大腸癌細胞由来 Caco-2 細胞)

1. 緒言

近年、食生活の変化と高齢化に伴い心血管障害が増加し、その原因としてのメタボリックシンドロームや動脈硬化への対策が必要とされている。これらの発症リスクとしては肥満、内臓脂肪、LDL コレステロール、インスリン抵抗性などが挙げられているが、いずれも食事性脂質の関与が大きく、特に食後高脂血症の影響が注目されている。また、糖尿病や腎臓病に多く見られる動脈硬化性疾患にも食事性脂質の関与が示唆されており、これらの疾患の危険因子の一つと考えられる食後高脂血症研究において、食事由来の腸管リポ蛋白であるカイロミクロン（以下 CM）の分泌・代謝の分析が重要になってきている。

CM は中核部に疎水性のトリグリセライド（以下 TG）とコレステロールエステルをもち、表層を両親媒性のリン脂質、遊離コレステロールおよびアポ蛋白（apolipoprotein, 以下 apo）がおおった巨大なリポ蛋白である。apoB48 は CM を粒子として統合する主要なアポ蛋白であり 1 粒子当たり 1 分子存在している。CM の分析には apoB48 の測定が有用であるが、apoB48 は apoB100 と共通の遺伝子から翻訳される部分ペプチドであり、apoB100 の N 末端側とアミノ酸配列構造が同一であるため、特異的に測定するための抗体を得ることは難しいと考えられてきた。しかし、1997 年我々が apoB48 の C 末端の合成ペプチドを用いて apoB48 特異的モノクローナル抗体 4C8 を樹立し、

これを用いて 2005 年 Kinoshita らが ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 系を開発し、apoB48 の定量測定が可能となった¹⁾。

本研究では、腸管リポ蛋白の CM を分析するにあたり 1989 年に Hidalgo らにより樹立された²⁾ ヒト大腸がん由来の細胞株である Caco-2 細胞株を用いた。Caco-2 は多孔性メンブレンをもつ二重底ディッシュに濃密に播種して極性培養を行うと単層を形成し、2～3 週間培養を継続すると分化して小腸様の吸収上皮としてのさまざまな特性を発現する。我々は Caco-2 細胞極性培養系において、管腔側に脂質ミセルを加えると細胞が吸収して基底膜側に apoB48 を含むカイロミクロンが分泌されることを観察し、実験系として構築した³⁾。

近年、食品成分が動脈硬化予防に効果があると関心を集めている。血清脂質低下作用については、大豆イソフラボンや茶カテキンなどがよく知られているが、発酵乳についても 1974 年のマサイ族を対象とした研究⁴⁾を初めとしてマウス、ラット、ヒトで血中コレステロール低下作用が認められるとの報告がある^{5) 6) 7) 8) 9)}しかし、いずれも動物、細胞レベルで様々な研究が行われているものの、apoB48 分泌を検討した報告は少なく、特異的な ELISA 法を用いた報告はこれまでにない。

我々は CM 分泌抑制を通じて動脈硬化予防効果が期待される食品成分を探索することの一環として、本研究においては、腸管に対し種々の影響を及ぼし、血清脂質の改善作用も報告がある乳酸菌について、Caco-2 における脂質代謝に与える影響を観察した。

2. 方法

Caco-2 (Passage number 43、理研バイオリソースセンターより譲渡) は Chateau らの方法に従い¹⁰⁾ 多孔膜メンブレンをもつ二重底培養ディッシュを用いて極性培養した。胆汁酸を加えて超音波処理した脂質ミセルを乳酸菌とともに管腔側に添加し腸管細胞に吸収させ、その結果基底膜側に分泌される CM の apoB48 の定量を行った。

2-1. 細胞の培養と二重底培養ディッシュへの播種

Caco-2 細胞は DMEM: ダルバッコ変法イーグル培地「ニッスイ」① (日本製薬株式会社)、10%ウ

シ胎児血清 (FBS、GIBCO)、10% NaHCO₃、0.5% Penicillin Streptomycin (GIBCO) を用いて、CO₂ インキュベーター (37℃、5% CO₂) で培養した。継代の後、多孔性メンブレンフィルター付きの二重底培養ディッシュ (6well plate、24mm insert polycarbonate membrane、多孔膜ポア半径 0.4μm、Costar) の上部槽に DMEM (FBS-) に懸濁して濃厚播種 (6.0×10^4 cells/cm²) し、基底膜側は DMEM (FBS+) とし、3 週間培養した。電気抵抗は Millicell ERS-2 (MILLIPORE) を用いて測定し、単層膜の形成を確認した。本実験では電気抵抗値は約 800 Ω・cm² を基準とした。

2-2. 脂質ミセルの作成

脂質ミセルは以下の様に作成した¹⁰⁾。培地 1ml あたり 100mM oleic acid (SIGMA) (以下 OA) 6μl、25mM cholesterol (SIGMA) (以下 Chol) 2μl、100mM 2-monooleoylglycerol (SIGMA) (以下 2-MO) 2μl、100mM phosphatidylcholine (SIGMA) (以下 PC) 2μl、100mM lysophosphatidylcholine (SIGMA) (以下 LPC) 2μl を滅菌処理した試験管内で混合し窒素下で乾燥した。DMEM (FBS-) を溶媒とし調製した胆汁酸 (24mM sodium taurocholate (SIGMA) (以下 TC) を培地 1.5ml あたり 124μl 分注し 10 分間超音波処理した (ULTRASONIC300, J.M.NEY COMPANY)。さらに 1well あたり 1.5ml になるように DMEM (FBS-) を加えて、1 分間超音波処理し脂質ミセルを作成した。培地中の最終濃度は以下の通りである。OA: 600μM、Chol: 50μM、2-MO: 200μM、PC: 200μM、LPC: 200μM、TC: 2mM。

2-3. 乳酸菌の培養

L-55 乳酸菌 (Lactobacillus acidophilus strain L-55、オハヨー乳業株式会社より提供)^{11) 12) 13)} を Lactobacilli MRS Broth (Difco) にて 37℃、24 時間前々培養した後、前培養、本培養と 2 回植え継ぎ同様に培養を行った。本培養後、0.75% の生理食塩水を用い 10 倍希釈を 4～5 段階繰り返し 10⁻⁴、10⁻⁵ 倍に希釈し寒天培地での培養にて菌数を確認した。培養液を 3,000rpm、10 分間の遠心分離によって乳酸菌を回収し、PBS (-) を用いて 2 回菌体を洗浄した。洗浄毎の遠心分離は上記条件で行った。

2-4. 乳酸菌の調製・添加と培地の回収

2-3 において回収した L-55 乳酸菌を下記の条件 (1)~(3) で培養系管腔側に添加し、脂質ミセル添加 40 時間後に基底膜側培地を回収した。

(1) 生菌添加と死菌添加の比較

L-55 乳酸菌の生菌を PBS で 3 回洗浄した後、100℃ で 30 分間加熱処理し死菌を作成した¹⁴⁾。100CFU/cell Caco2 濃度で生菌と死菌の懸濁液作成し培養系管腔側に添加した。添加 24 時間後に培地を取り除き、2-2 で作成した脂質ミセルを添加した。

(2) 乳酸菌の菌数、添加のタイミングによる比較（生菌による検討）

L-55 乳酸菌（生菌）100CFU/cell Caco2、1000CFU/cell Caco2 の懸濁液を作成し培養系管腔側に添加した。添加 24 時間後に培地を取り除き、2-2 で作成した脂質ミセルを添加した。

また、L-55 乳酸菌（生菌）100CFU/cell Caco2、1000CFU/cell Caco2 の懸濁液を脂質ミセルで懸濁液作成し、管腔側に添加した。

(3) オリゴ糖添加の有無による比較（生菌による検討）

5% に調製したフルクトオリゴ糖 (Fructooligosaccharides (Mixture of 1-Ketose, Nystose and 1-Fructofuranosyl-D-nystose)、和光純薬工業株式会社)

を (2) の条件において各々に 1.5μl 添加する（最終濃度 0.005%）。オリゴ糖添加は乳酸菌と同時に添加とした。

2-5. 培地中に分泌されたアポ蛋白の測定

培地中の apoB48 を ELISA 法 (Human ApoB-48 ELISA KIT :AKHB48J, Shibayagi, Gunma, Japan) により測定した。

2-6. 統計処理

Student の t 検定にて解析した。p < 0.05 を有意差ありとした。

3. 結果

(1) 生菌添加と死菌添加の比較

乳酸菌の生菌添加と死菌添加において、いずれもミセルのみと比べて apoB48 分泌が有意に抑制された。生菌添加と死菌添加の比較では apoB48 分泌に大きな差は認められなかった。(図 1)

(2) 乳酸菌の菌数、添加のタイミングによる比較（生菌による検討）

乳酸菌の添加菌数の比較では菌数 100CFU/cell Caco2 添加に比べて 1000CFU/cell Caco2 添加で apoB48 分泌がより抑制された。(図 2) また、乳酸菌添加のタイミングによる比較では、菌数 100CFU/cell Caco2 添加において脂質ミセル添加の 24 時間前に添加した

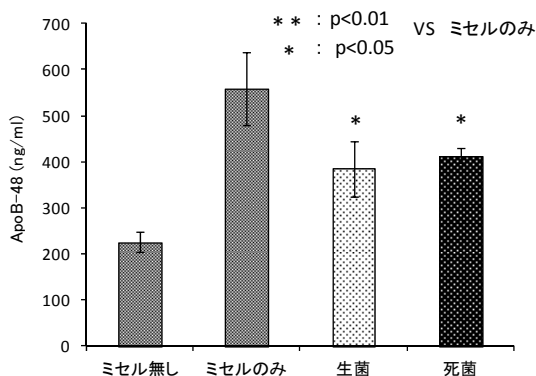


図 1 乳酸菌が apoB48 分泌に与える影響
生菌と死菌添加の比較
(菌数 100CFU/cell Caco2、24 時間前添加)

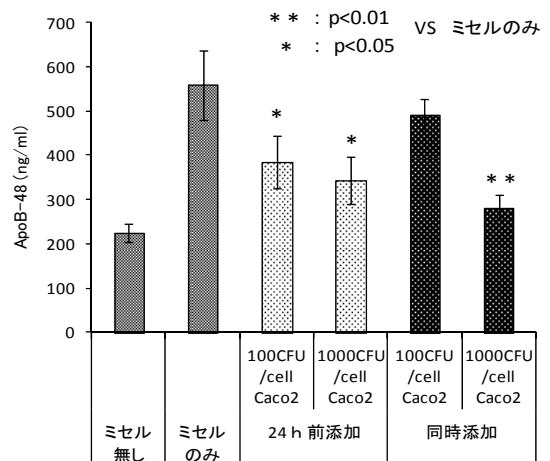


図 2 乳酸菌の菌数と添加のタイミングによる
apoB48 分泌に与える影響

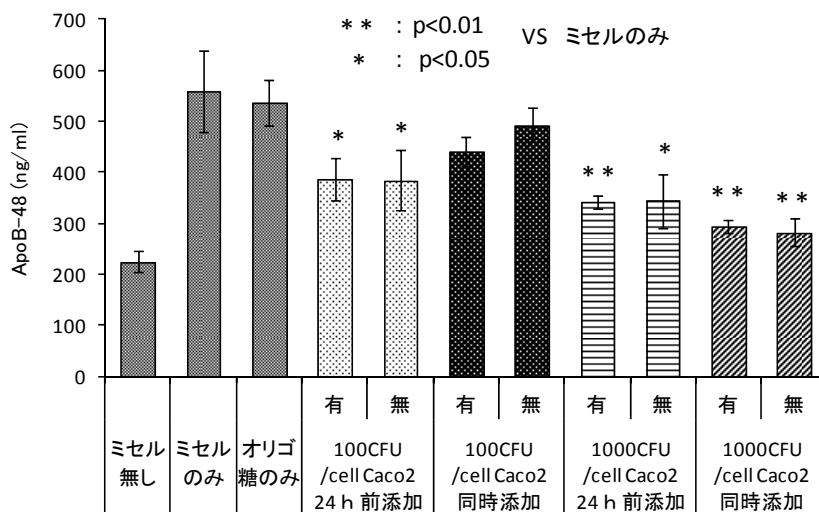


図3 乳酸菌添加時のオリゴ糖添加の有無による apoB48 分泌に与える影響

場合は同時添加に比べて apoB48 分泌が抑制された。1000CFU/cell Caco2 添加では逆の傾向がみられた。(図2)

(3) オリゴ糖添加の有無による比較 (生菌による検討)

乳酸菌の菌数 100CFU/cell Caco2 添加での脂質ミセル添加の24時間前添加と同時添加、菌数 1000CFU/cell Caco2 添加での脂質ミセル添加の24時間前添加と同時添加、いずれの条件下でもオリゴ糖添加の有無において apoB48 分泌に大きな差はみられなかった。(図3)

4. 考察

これまで乳酸菌においては1974年 Mann と Spoerry らがマサイ族を対象にした試験において初めて発酵乳の血清コレステロール低下作用を報告⁴⁾した後、多くの研究が行われている。発酵乳は血清コレステロールの低下作用があるという報告^{5) 6) 7) 8) 9)}と、作用が認められないという報告^{15) 16)}がある。これについては血清コレステロール低下作用におよぼす影響は菌株の違いに依存するものであったとの報告^{17) 18)}もあり、特定の菌株についての血清コレステロール低下作用を検討した報告^{19) 20) 21) 22)}がある。

コレステロール低下作用の機序については、乳酸菌にコレステロールや胆汁酸吸着能があるとの報告^{17) 23)}

や、胆汁酸脱抱合作用による胆汁酸の腸管吸収阻害^{24) 25)}や、糞便中にコレステロールや胆汁酸の排泄量が増加するなどの報告^{26) 27)}がある。また、Ley らは乳酸菌が腸においてコレステロールをコプロスタノールに変換することでコレステロールを低下させるとの報告²⁸⁾をしている。

今回用いた L-55 乳酸菌は腸管への生着率が高いことが知られ、花粉症・アトピー性皮膚炎におけるアレルギー反応を抑制することなどが報告^{11) 12) 13)}されているが、脂肪の吸収と分泌についての知見はない。この度、L-55 の添加により生菌、死菌の添加ともに apoB48 の合成と分泌の減少がみられた。一方、生菌と死菌の間では、添加における apoB48 分泌の減少に有意な差はみられなかった。吸収・分泌をみた今回の検討とは異なるが2002年の Kimoto らの死菌に比べ生菌がよりコレステロールを除去したとの報告¹⁷⁾がある。また2014年、119-2 株による検討で死菌では菌体のコレステロール吸着効果は認められなかったが、動物を用いたコレステロール低下効果試験では死菌でも有意な低下効果が確認されたとの報告²⁹⁾がある。

乳酸菌生菌による添加菌数と添加のタイミングによる比較では、同時添加において 100CFU/cell Caco2 に比べて 1000CFU/cell Caco2 の方が apoB48 の分泌が抑制されていたが、24時間前添加では apoB48 の分泌に

大きな差はみられなかった。これはについては 24 時間の孵置中に乳酸菌が増殖したことが推察される。また 1000CFU/cell Caco2 の添加で添加のタイミングによる大きな差がみられなかったのは、増殖の余地がなかった可能性がある。さらに乳酸菌とともに添加したオリゴ糖の有無による比較では差はみられなかった。ラットにおいてはフルクトオリゴ糖についてのみで血清脂質濃度を低下させるとの報告があるが、今回の結果では異なった結果となった。種差もあるが、オリゴ糖の添加の濃度については検討の余地があると考ええる。

CM や apoB100 を主構成タンパクとする VLDL などの TG-rich リポ蛋白の代謝産物である CM レムナントや VLDL レムナントは、粒子上のアポ蛋白 E を介して肝臓のレムナント受容体に結合し、通常、健常者においては速やかに代謝される。一方、レムナントの代謝が遅延している状態が高レムナント血症であり、滞留したレムナントは血管内膜下に侵入しやすく動脈硬化惹起性のリポ蛋白である。同様に動脈硬化惹起性がある酸化 LDL はスカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれ、動脈硬化の初期巣を形成することが知られているが、マクロファージにはスカベンジャー受容体とは別にアポ B48 受容体^{30) 31)}が存在し、CM レムナントをマクロファージに取り込み、泡沫化そして動脈硬化巣の形成に働くことが知られている。2000 年 Brown らは頸動脈、大動脈、冠動脈の動脈硬化巣の泡沫化したマクロファージに存在する部位に一致してアポ B48 受容体の陽性染色を認めている³⁰⁾。また、2008 年には Nakano らが 4C8 を用いて人間の動脈硬化性プラーク中に apoB48 が存在することを報告している³²⁾。

ApoB48 は CM の粒子上に 1 粒子に対して 1 分子存在しているため、今回、観察された apoB48 の減少は分泌された CM の粒子数の減少を反映していると示唆される。生体内ではリポ蛋白リパーゼの活性は十分に存在するので、酵素量が正常であれば、カイロミクロントリグリセライドの水解は、非飽和的に進行すると考えられ、従ってトリグリセライドが水解された後は、少数の正常のサイズの CM レムナント粒子が産生されることになる。

本研究では L-55 株乳酸菌が CM レムナント粒子数の減少を介し動脈硬化抑制的に働く可能性が示唆され

た。今回は生菌と死菌添加による apoB48 分泌減少に大きな差がみられなかったため添加のタイミング・菌数による検討を生菌のみとしたが、今後死菌における検討も行いたい。また、乳酸菌の血清コレステロール低下作用は菌株によるとの研究報告もあり、今後、CM 分泌についてもいくつかの菌株をもちいて比較検討することも有用と考える。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、乳酸菌 L-55 株をご提供していただきましたオハヨー乳業株式会社様、また乳酸菌培養におきまして貴重なご助言、ご協力をいただきました本学秋田修教授、食品加工学研究室小針清子前助手に深く感謝を申し上げます。

文献

- 1) Kinoshita M, Kojima M, Matsushima T, Teramoto T: Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA. *Clin Chim Acta*, 351 (1-2) : 115-120 (2005)
- 2) Hidalgo JJ, Raub TJ, Borchardt RT: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96 (3) :736-749 (1989)
- 3) 富重慶子、細川優、中川靖枝、松島照彦：培養腸管細胞からのカイロミクロン ApoB-48 の合成、分泌に対し curcumin が与える影響、日本臨床栄養学会雑誌、37 (2)、122-129 (2015)
- 4) Mann GV: Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai., *Am J Clin Nutr.*, 27 (5), 464-9 (1974)
- 5) Akalin AS, Gönç S, Düzel S.: Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice., *J Dairy Sci.*, 80 (11), 2721-5 (1997)
- 6) GRUNEWALD K K: Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*., *J Food Sci.*, 47 (6), 2078-2079 (1982)
- 7) Hepner G, Fried R, St Jeor S, Fusetti L, Morin R.: Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk., *Am J Clin Nutr.*, 32 (1), 19-24 (1979)
- 8) Jaspers D.A., Massey L.K.: Luedecke L.O., Effect of consuming yoghurts prepared with three culture strains on human serum lipoproteins., *J Food Sci.*, 49, 1178-1181 (1984)
- 9) Agerholm-Larsen L, Bell ML, Grunwald GK, Astrup A.: The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies., *Eur J Clin Nutr.*, 54 (11), 856-60 (2000)

- 10) Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J, Demignot S: Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol*, 202 (3) :767-776 (2005)
- 11) Sunada Y, Nakamura S, Kamei C.: Effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-55 on experimental allergic rhinitis in BALB/c mice., *Biol Pharm Bull*, 30 (11), 2163-6 (2007)
- 12) 木村五郎、岡田千春、平野淳、宗田良、高橋清、赤木博文、天野佳美、大村悦子、中重敏人、砂田洋介、藤井祐介、中村昇二: *Lactobacillus acidophilus* L-55 含有ヨーグルト飲用のスギ花粉症に対する臨床効果の検討、アレルギー、61 (5)、628-41 (2012)
- 13) Sunada Y, Nakamura S, Kamei C.: Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain L-55 on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice., *Int Immunopharmacol*, 8 (13-14), 1761-6 (2008)
- 14) Reina Takisawa, Yousuke Nishitani, Masashi Mizuno and Ro Osawa: Anti-Inflammatory Effect of *Bifidobacterium longum* on Macrophage-Like THP-1 Cells via Epithelial Cell Caco-2., *Bioscience Microflora*, 28 (2), 45-48 (2009)
- 15) Massey LK.: Effect of changing milk and yogurt consumption on human nutrient intake and serum lipoproteins., *J Dairy Sci*. 67 (2), 255-62 (1984)
- 16) Thompson LU, Jenkins DJ, Amer MA, Reichert R, Jenkins A, Kamulsky J.: The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol., *Am J Clin Nutr*, 36 (6), 1106-11 (1982)
- 17) 鈴木豊、海津浩美、山内吉彦: 高コレステロール飼料を摂取させたラットの血清中コレステロール濃度に及ぼす発酵乳の影響、日畜会報、62 (6)、565-571 (1991)
- 18) Kimoto H1, Ohmomo S, Okamoto T.: Cholesterol removal from media by lactococci., *Dairy Sci*, 85 (12), 3182-8 (2002)
- 19) Watanabe S, Katsube T, Hattori H, Sato H, Ishijima T, Nakai Y, Abe K, Sonomoto K.: Effect of *Lactobacillus brevis* 119-2 isolated from Tsuda kabu red turnips on cholesterol levels in cholesterol-administered rats., *J Biosci Bioeng*, 116 (1), 45-51 (2013)
- 20) Huang WC, Chen YM, Kan NW, Ho CS, Wei L, Chan CH, Huang HY, Huang CC.: Hypolipidemic effects and safety of *Lactobacillus reuteri* 263 in a hamster model of hyperlipidemia., *Nutrients*, 7 (5), 3767-82 (2015)
- 21) 梶本修身、平田澤、青江誠一郎、高橋丈生、鈴木豊、田中博: 境界域及び軽度高コレステロール血症に対し *Lactobacillus gasseri* (ガゼリ菌 SP 株) を含有する発酵乳は血清コレステロール値を低下させる、日本乳酸菌学会誌、13 (2)、114-124 (2002)
- 22) Manabu KAWASE, Hideo HASHIMOTO, Masataka HOSODA, Hirotugu MORITA, Akiyoshi HOSONO: Serum Cholesterol-lowering Effect of Fermented Milk with *Streptococcus thermophilus* TMC 1543., *Anim.Sci.J.*, 72 (1), 54-62 (2001)
- 23) Usman1, Hosono A.: Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains., *J Dairy Sci*, 82 (2), 243-8 (1999)
- 24) Klaver FA1, van der Meer R.: The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity., *Appl Environ Microbiol*, 59 (4), 1120-4 (1993)
- 25) De Rodas BZ, Gilliland SE, Maxwell CV.: Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet., *J Dairy Sci*, 79 (12), 2121-8 (1996)
- 26) Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C.: Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*., *Appl Environ Microbiol*, 49 (2), 377-81 (1985)
- 27) Fukushima M1, Nakano M.: Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet., *Br J Nutr*, 76 (6), 857-67 (1996)
- 28) Lye HS, Rusul G, Liong MT.: Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol., *J Dairy Sci*, 93 (4), 1383-92 (2010)
- 29) 渡部忍: 津田かぶ由来乳酸菌 (*Lactobacillus brevis* 119-2) のコレステロール低下効果、島根県産業技術センター研究報告 (Report of the Shimane Institute for Industrial Technology)、(50)、1-9 (2014)
- 30) Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo WL, Li R, Song R, Bradley WA, Gianturco SH: A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (13), 7488-7493 (2000)
- 31) Gianturco SH, Ramprasad MP, Lin AH-Y, Song R, Bradley WA: Cellular binding site and membrane binding proteins for triglyceride-rich lipoproteins in human onocyte-macrophages and TH P-1 monocytic cells. *J Lipid Res*, 35, 1674-1687 (1994)
- 32) Nakano T, Nakajima K, Niimi M, Fujita MQ, Nakajima Y, Takeichi S, Kinoshita M, Matsushima T, Teramoto T, Tanaka A: Detection of apolipoproteins B-48 and B-100 carrying particles in lipoprotein fractions extracted from human aortic atherosclerotic plaques in sudden cardiac death cases. *Clin Chim Acta*, 390 (1-2), 38-43 (2008)